

Rec'd PCT/PTO 22 FEB 2005

PCT/EP03/09355

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP03/9355

REC'D 16 JAN 2004

WIPO PCT

EPO-BERLIN

18-12-2003

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 38 922.5

Anmeldetag:

22. August 2002

Anmelder/Inhaber:

Universitätsklinikum Charité Medizinische Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin/DE

Bezeichnung:

Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zu-
sammenhang mit Transplantat-Reaktionen

IPC:

C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

5

ANWALTSKANZLEI
Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider
Patente Marken Design Lizenzen

10 Gulde Hengelhaupt Ziebig & Schneider, Schützenstraße 15-17, 10117 Berlin

Patentanwälte
European Patent and Trademark Attorneys*

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.*
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing.³
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.²
Henry Schneider, Dipl.-Ing.*
Wilfried H. Goesch, Dipl.-Ing.¹
Dieter K. Wicht, Dipl.-Ing.¹
Isolde U. Winkler, Dipl.-Ing.*
Dorit Rasch, Dipl.-Chem.*
Dr. Sven Lange, Dipl.-Biologe²

Rechtsanwalt

Jörg K. Grzam

Schützenstraße 15-17
D-10117 Berlin

Tel.: 030/206230 / 030/264 13 30
Fax: 030/264 18 38

office@berlin-patent.net
www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference
P153902DE-La
Datum/date
Berlin, 22. August 2002

45
Universitätsklinikum Charité
Medizinische Fakultät der Humboldt-
Universität zu Berlin
Schumannstraße 20/21
10117 Berlin

50

Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im
Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen

5

Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen

10

Beschreibung

20

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle als Immunmarker zur Detektion von Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen, wobei Transplantat-Reaktionen eine Toleranz, eine Rejektionskrise oder eine Abstoßung sein können.

30

Für eine erfolgreiche Organtransplantation ist es notwendig, dass das Spenderorgan histologisch möglichst weitgehend mit dem Empfängerorgewebe übereinstimmt. Diese Übereinstimmung wird unter anderem durch das HLA-System (Abk. für (engl.) human leucocyte antigen) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein komplexes System von Gewebantigenen, die auf fast allen Zellen vorkommen. Dieses System spielt eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen (Erkennung von „Selbst“ und „Nichtselbst“). Vor jeder Transplantation wird deshalb eine so genannte Gewebetypisierung bei Organspender und -

5 empfänger vorgenommen, um eine möglichst weitgehende HLA-Kompatibilität zu gewähren.

Aufgrund des extremen genetischen Polymorphismus existiert eine außerordentlich große Anzahl verschiedener HLA-Moleküle. Eine vollständige Übereinstimmung wird ausschließlich
10 bei eineiigen Zwillingen beobachtet, ansonsten sind HLA-Moleküle für jeden Menschen einzigartig.

Problematisch ist jedoch, dass trotz einer weitgehenden HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender eine Abstoßungsreaktion gegen das transplantierte Organ nicht
15 ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser Schwierigkeiten stellt die Transplantation die Therapie der Wahl bei irreversiblen Organversagen dar.

Der ansteigende Bedarf an Organtransplantationen zusammen mit dem verminderten Angebot an Organen sowie die oben
20 beschriebenen Probleme erfordern eine Optimierung der bekannten Therapien. Durch die Einführung neuer verbesserter Immunsuppressiva konnte die 1-Jahrüberlebensrate auf 90% erhöht werden. Allerdings konnten die Langzeittransplantatüberlebensraten bisher nicht
25 zufriedenstellend verbessert werden. Trotz moderner Immunsuppressiva kommt es immer noch bei der Mehrzahl der Patienten zur Entwicklung chronischer Transplantatdysfunktionen. Klinische und subklinische akute Reaktionen, auch wenn sie zunächst erfolgreich mit einer
30 Rejektionstherapie behandelt werden, stellen dabei den größten unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung dieser späten Transplantatverluste dar. Eine effiziente Diagnostik und/oder Therapie derartiger - vor allem

5 subklinisch verlaufender - Prozesse ist daher von großer Wichtigkeit.

Eine Induktion einer Langzeit- und vornehmlich medikamentenfreien Transplantatakzeptanz ohne Beeinträchtigung der Organ-, Gewebe- oder Zellfunktionen und der
10 Immunkapazität des Transplantatempfängers ist daher von großer Bedeutung. Klinisch wird die Toleranz als permanentes Transplantatüberleben mit normaler Organfunktion bei Abwesenheit akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen und dem Erhalt der antimikrobiellen
15 Immunreaktivität definiert.

Neue Strategien zur Induktion einer Transplantattoleranz bestehen in der Applikation immunregulatorischer Proteine oder in einer Induktion eines Chimerismus. Bei den immunregulatorischen Proteinen kann es sich entweder um
20 Antikörper handeln, die eine Depletion der donor-reaktiven T-Zellen bewirken, z.B. anti-CD3-Immunotoxin, oder um Antikörper und Proteine, die die Aktivierung der donor-reaktiven T-Zellen beeinflussen, z.B. anti-CD4-Antikörper, anti-CD40L-Antikörper oder CTLA4-Ig. Chimerismus bedeutet
25 das parallele Vorhandensein von Blutleukozyten des Spenders und des Empfängers mit Hilfe nicht-myeloablativer Verfahren zur Transplantation von Stammzellen des Spenders.

Bisher erfolgte nach der Transplantation eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates dadurch, dass
30 die Funktion des Transplantates als Maß herangezogen wird; z.B. durch die Bestimmung des Serumkreatininspiegels im Falle eines Nierentransplantates. Außerdem werden Biopate entnommen und nach dem „Banff Score“ histologisch

5 beurteilt. Damit kann beurteilt werden, ob Veränderungen
assoziiert mit einer akuten Abstoßung - Infiltration
mononukleärer Zellen - oder chronische Abstoßungen
(Vaskulopathie) nachweisbar sind.

10 Klinisch manifeste Rejektionen werden durch Funktions-
verschlechterung der Organe definiert, wie beispielsweise
Herzfunktion, dem Serumkreatinin in dem der Lungenfunktion
oder anderen. Leider stehen diese Funktions-
verschlechterungen am Ende einer Effektkette. Eine
frühzeitige Diagnostik bereits subklinisch ablaufender
15 Prozesse wäre sehr hilfreich. Auch ist eine
Funktionsverschlechterung nicht immer durch eine Rejektion
bedingt; es gibt auch andere Ursachen wie Toxizität und
Infektionen, die differentialdiagnostisch abgegrenzt werden
müssen, was gegenwärtig viel Zeit beansprucht und oft sehr
20 schwierig ist. Subklinisch verlaufende Reaktionen können
bisher nur durch Protokollbiopsien und konventionelle
Histologie, zumindest innerhalb gewisser Grenzen,
verlässlich beurteilt werden. Jedoch werden dabei auch
Infiltrate als negativ beurteilt, die möglicherweise eine
protektive Wirkung auf das Transplantat haben, wie in
25 Tierexperimenten gezeigt werden konnte. Für Nieren-
transplantate wurde nachgewiesen, dass molekularbiologische
Untersuchungen im Urin eine klinisch manifeste Rejektion
reflektieren können, aber es fehlen Untersuchungen zum
subklinischen Bereich der Rejektionen. Es besteht also ein
30 großer Bedarf an Markern für das Monitoring von
Transplantaten (Biopsie, Urin, Lavage, Blut etc), um
unerwünschte Immunreaktionen gegen das Transplantat

5 rechtzeitig - d.h. möglichst vor der Organschädigung - und differentialdiagnostisch sicher - als Abgrenzung gegen andere Prozesse, die die Organfunktion beeinträchtigen - zu erfassen.

10 Aufgrund der Nebenwirkungen der chronischen Applikation der derzeit üblichen Mehrfachimmunsuppressivaschemata wird immer wieder versucht, bei gut gehender Funktion einzelne oder mehrere der immunsuppressiven Komponenten abzusetzen -
nachteilhafterweise ist dieser Ansatz immer durch das Auftreten von akzelerierten Abstoßungsprozessen, manchmal
15 erst Jahre nach Absetzen, gefährdet. Es fehlt völlig an Parametern, die ein derartiges Vorgehen verlässlich individuell optimieren könnten. Eine Verbesserung der bisherigen Strategien durch Einführung toleranzinduzierter Protokolle würde die Therapie durch weniger Nebenwirkungen
20 und weniger Kosten revolutionieren. Die Übertragung der oben erwähnten toleranzinduzierenden Therapien auf den Menschen birgt jedoch etliche Gefahren, da nach Absetzen der Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager identifiziert werden müssen, um eine irreversible Schädigung des Transplantates durch Rejektion zu verhindern. Selbst in Tiermodellen werden niemals 100% der Empfänger tolerant.

30 Nachteilhaft bei den bisherigen Methoden ist es, dass keine Entscheidungen über das sichere Absetzen einer immunsuppressiven Therapie getroffen werden können, ohne dabei das Auftreten von Rejektionskrisen zu riskieren.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die bekannten Methoden es nicht ermöglichen, während oder nach der Behandlung, auch

5 nach konventionellen Therapien, bevor eine Transplantats-
funktionsverschlechterung auftritt, eine Vorhersage von
Rejektionskrisen zu ermöglichen. Die bisher zur Verfügung
stehenden diagnostischen Mittel und Methoden sind nur
begrenzt zur Beurteilung einer toleranzinduzierenden
10 Therapie einsetzbar. Die Beurteilung der Therapie
hinsichtlich der Funktion des Transplantates - z.B. des
Serumkreatinins - kommt zu spät, da es bei einem
nachweisbaren Anstieg des Serumkreatinins schon zu einer
Schädigung des transplantierten Organs, beispielsweise der
15 Niere, gekommen ist. Hinsichtlich der toleranzinduzierenden
Therapien bedeutet ein signifikanter Anstieg des
Serumkreatinins ein Fehlschlagen der Therapie und für den
Patienten wahrscheinlich das Umsteigen auf konventionelle
Immunsuppressiva mit den bekannten Nebenwirkungen. Auch die
20 bekannte Analyse einer Biopsie ist in diesem Fall nur
bedingt hilfreich, da viele toleranzinduzierenden
Therapien, wie z.B. mit anti-CD4-Antikörpern nur bedingt
die Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat
verhindern. Innerhalb der bisherigen Methoden und Verfahren
würde dies als akute Abstoßungs-, bzw. Rejektionskrise
betrachtet werden, und der Patient würde mit hochdosierten
konventionellen Immunsuppressiva behandelt werden. Eine
hochdosierte Gabe konventioneller Immunsuppressiva kann
sich jedoch zusätzlich negativ auf den Erfolg der toleranz-
30 induzierten Therapie auswirken, was ebenfalls ein
Fehlschlagen der Therapie bedeuten würde. Aber auch für die
konventionellen Immunsuppressionen wären verbesserte
diagnostische Mittel und Methoden hinsichtlich der
Früherkennung klinischer und subklinischer akuter

5 Abstoßungskrisen und beginnender chronischer Rejektions-
prozesse hilfreich. Dies würde es unter anderem
ermöglichen, die Therapie zu variieren bevor eine
nachweisbare Schädigung des Transplantates - z.B. Anstieg
des Serumkreatinins - vorliegt. Außerdem kann eine
10 Verschlechterung der Organfunktion auch durch Nebenwirkung
einer hochdosierten immunsuppressiven Therapie oder durch
Infektionen im Transplantat hervorgerufen werden, was durch
bekannte Methoden ebenfalls nicht detektiert werden kann.

15 Aufgabe der Erfindung ist es daher, effiziente und zu-
verlässige Immunmarker bereitzustellen, welche eine sichere
und schnelle Vorhersagbarkeit des Risikos einer
Transplantatabstoßung bzw. des Fehlen selbiger - als Form
einer Toleranz - in medizinischer Prophylaxe, klinischer
Verlaufskontrolle oder der Transplantatnachbehandlung
20 ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem
durch die Bereitstellung eines isolierten Nucleinsäure-
moleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 25 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -
8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen
hybridisiert,
- 30 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie

5 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

10 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

15 Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit Entzündungen, insbesondere chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Läsionen, allgemeinen Wunden und Transplantat-Reaktionen, insbesondere mit Transplantatrejektionen oder anderen
20 Transplantatdysfunktionen sowie dem Ausbleiben dieser - als Form der Transplantattoleranz - assoziiert sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz ausgewählt aus der
25 Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40% homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nucleotidsequenzen bzw. den mit diesen Nucleotidsequenzen hybridisierenden Sequenzen funktions-
30 analog zu sein, dass die Homologen bei Transplantat-Reaktionen ein Verhalten zeigen, das Rückschlüsse auf das

5 Transplantat und dessen Verhältnis zum Empfängerorganismus zulässt.

Funktionsanaloge Sequenzen sind im Sinne der Erfindung all jene Sequenzen, die der Fachmann als gleichwirkend identifizieren kann. Beispielsweise ist es möglich, dass
10 der Fachmann in verschiedenen Versuchstieren, wie z.B. der Ratte oder dem Kaninchen, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle identifiziert und so aufgrund von Homologie-Untersuchungen in der Lage ist, funktionsanaloge Strukturen in anderen Organismen, wie beispielsweise Schimpansen oder
15 Hunden, zu identifizieren. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass der Fachmann aufgrund seiner Kenntnis der in der Maus oder Ratte gefundenen Nucleinsäuremoleküle auch in humanen Patienten Analoge und Homologe aufgrund von Homologie- oder Analogie-Untersuchungen detektiert.
20 Weiterhin ist es möglich, dass der Fachmann im humanen Bereich isolierte erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle in spezifischen Versuchstieren detektiert, mit denen bestimmte Transplantationsreaktionen untersucht werden können, wie beispielsweise in Schweinen oder auch in wirbellosen Organismen, wie z.B. Nematoden bzw. anderen Organismen, die
25 für spezifische Fragestellungen der Transplantationsbiologie herangezogen werden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nucleinsäuremolekül mindestens 60%,
30 vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% Homologie zu einem Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen

5 auf, wobei dieses Nucleinsäuremolekül eine biologische Aktivität wie die unter SEQ ID Nr. 1-8 aufgezeigten Sequenzen oder deren komplementären Sequenzen aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül eine genomische DNA, eine cDNA
10 und/oder eine RNA. Besonders bevorzugt ist das Nucleinsäuremolekül eine mRNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor
15 (im erfindungsgemäßen Vektor) umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle
20 und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nucleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so
25 wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nucleinsäuren sein, die mit den genannten Nucleinsäuremolekülen binden, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide,
30 Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nucleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper.

5 Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungsmoleküle ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-
10 Interferenzmolekül.

Die Autoantikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (z.B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der
15 vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle, als auch Autoantikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')₂ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven
20 Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

(1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
25

(2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine
30 intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette

5 erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;

(3) $F(ab')_2$, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; $F(ab')_2$ ist eine Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

(4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

(5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid. Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

Die Erfindung betrifft auch Vakzine, die das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das

5 Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls
mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei
dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an
sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und
10 Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in
der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder
Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich
der Galenik handeln.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion von
15 Tranplantat-Reaktionen in einer Probe von einem Patienten,
wobei in der Probe ein Level von mindestens einem
Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -
20 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,

b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen
hybridisiert,

c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotid-
25 sequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um
zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)
funktionsanalog zu sein,

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert
30 ist und ,

5 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10 bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen wird, wobei durch einen modifizierten Level in der Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die Transplantat-Reaktionen - was auch das Fehlen selbiger als Toleranz einschließt -
15 detektiert wird.

Als Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung wird demgemäß jede physiologische und pathophysiologische Wechselwirkung des Transplantates mit dem Empfängerorganismus aber auch jede isolierte Reaktion innerhalb des
20 Transplantates verstanden. Die Transplantat-Reaktion kann daher im Sinne der Erfindung eine Toleranz sein bzw. eine Abstoßung des Transplantates. Demgemäß ist eine Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung auch ein nicht pathologischer, d.h. ein normaler oder gesunder, Zustand,
25 in dem sich das Transplantat selbst und in Bezug auf den Empfängerorganismus befinden kann. Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit
30 chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme aus dem Patienten bzw. aus gewonnenen humoralen oder zellulären Bestandteilen des Patienten erfolgt insbesondere so, dass die entnommene

5 Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht.
Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale
dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge,
die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z.B. ein gesamtes
10 transplantiertes Organ, wie Leber, Milz, Blut oder aber auch
von nicht transplantierten Bestandteilen, wie z.B. dem
Immunsystem, zulässt. Für die Untersuchung können die
Proben durch Mischen, Zerteilen, Zerkleinern, Zugabe von
Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem
15 Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung
der Proben bekannt. Selbstverständlich kann es auch
vorgesehen sein, dass die Probe so entnommen wird, dass sie
keinem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Eine
Probe können alle biologischen und nichtbiologischen
Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten,
20 wie beispielsweise Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit
und andere.

Ein Transplantat im Sinne der Erfindung ist ein transplan-
tiertes oder zu transplantierendes Organ, Gewebe oder eine
Zelle bzw. eine Zellansammlung. Im Sinne der Erfindung
25 können Transplantate jedoch auch bestimmte Implantate sein,
die aus Stoffen bzw. Teilen bestehen, die zur Erfüllung
bestimmter Ersatzfunktionen für einen begrenzten Zeitraum
oder auf Lebenszeit in einen Körper eingebracht werden. Die
Implantate können beispielsweise aus anorganischer Materie
30 bestehen, die mit organischen Substanzen, wie
beispielsweise Knorpel oder Knochenzellen, beschichtet ist.

Unter einer Transplantatabstoßung gemäß der Erfindung ist
die Induktion einer Immunreaktion des Empfängers auf das

5 Transplantat zu verstehen, wobei eine Immunreaktion des
Empfängers eine spezifische Schutz- oder Abwehrreaktion des
Körpers gegen die Antigene bzw. andere Strukturen des
Transplantates ist.

10 Ein Patient im Sinne der Erfindung ist jeder Organismus,
der ein Transplantat umfasst, insbesondere ein humaner
Organismus. Ein gesunder Patient im Sinne der Erfindung ist
ein Patient, dessen Zustand es erlaubt, als Referenz für
das vorliegende Verfahren verwendet zu werden. Gesund im
15 Sinne der Erfindung muss nicht die völlige Abwesenheit von
Krankheiten, Transplantaten oder pathogenen Veränderungen
bedeuten. Der gesunde Patient stellt entweder einen
einzelnen Patienten oder eine Durchschnittsmenge von
Patienten dar, die als Vergleichsgruppe dergestalt dienen
können, dass eine Veränderung des Levels der genannten
20 Nucleinsäuremoleküle oder der Strukturen, für die sie
kodieren bzw. den Erkennungssubstanzen bestimmt werden
kann. Eine Modifikation des Levels im Vergleich zum
Kontrolllevel heißt, dass die genannten Nucleinsäure-
moleküle bzw. die oben genannten Immunmarker, wie
insbesondere die Peptide oder die Erkennungssubstanzen, in
25 ihrer Konzentration oder Aktivität als Protein, als
Nucleinsäuremolekül oder als Antikörper detektierbare
Veränderungen gegenüber dem Kontroll-Level aufweisen.

30 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das
Transplantat ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lunge,
Milz, Herz, Leber, Pankreas und/oder von Geweben,
insbesondere Inseln, Aorten, Knorpeln. Selbstverständlich
ist es möglich, dass die jeweils aufgezeigten Organe bzw.

5 Gewebestrukturen allein oder in Kombination transplantiert werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, eine
10 Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder als eine Konzentration von Isoformen bestimmt. Mit Vorteil kann der Fachmann verschiedene Möglichkeiten wählen, um den Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Bestimmung der
15 Peptidkonzentration, die durch das Nucleinsäuremolekül kodiert werden, mit spektrografischen Methoden. Es ist jedoch auch möglich, den Level auf der RNA- bzw. DNA-, insbesondere mRNA- und/oder cDNA-Ebene zu bestimmen oder beispielsweise über die Aktivität der durch sie kodierten
20 Proteine und/oder Peptide bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich möglich, dass der Level nur in dem Transplantat oder in Teilstücken desselben innerhalb oder außerhalb des Körpers bestimmt wird bzw. dass er in dem umgebenden Gewebe bzw. Körperflüssigkeiten bzw. in Biopsiematerialien oder in Flüssigkeiten, wie
25 beispielsweise Urin, Lymphe oder Blut, detektiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
30 ist die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf, der durch das erfindungsgemäße Verfahren detektiert wird. Der

5 Abstoßungsverlauf und die Abstoßungsreaktion können
beispielsweise klinisch bzw. subklinisch verlaufen. Eine
Toleranz im Sinne der Erfindung ist beispielsweise eine
lang anhaltende normale Funktion des transplantierten
Organs ohne Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über
10 mehr als 100, bevorzugt 200, ganz besonders bevorzugt 300
Tage.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
wird durch einen verminderten Level eines
Nucleinsäuremoleküls umfassend eine Nucleotidsequenz
15 ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären
Nucleotidsequenzen,
- 20 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen
hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie
25 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)
funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c)
degeneriert ist und
- 30 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz
nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen,

5 Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder
Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer
Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10 die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die
Rejektionskrise detektiert. Ein Abstoßungsverlauf kann
beispielsweise der Verlauf einer Abstoßungsreaktion mit
bzw. ohne Medikamentengabe sein, wobei diese Medikamente
beispielsweise immunsuppressierende Substanzen sein können.
Mit Vorteil kann durch den verminderten Level der
Nucleotidsequenzen bzw. deren komplementären
15 Nucleotidsequenzen bzw. Nucleinsäuremolekülen, welche mit
diesen Nucleotidsequenzen unter stringenten Bedingungen
hybridisieren oder Nucleotidsäuremoleküle, die eine
ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten
Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, bestimmt
20 werden, ob das Transplantat selbst oder in Bezug auf den
Empfängerorganismus zu unphysiologischen bzw.
pathologischen Prozessen neigt.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls
umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe
umfassend

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1
und SEQ ID Nr. 2 oder deren komplementären
30 Nucleotidsequenzen,

5 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

10 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

15 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

20 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

25 die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise detektiert. Im Sinne der Erfindung gehören zu den genannten Nucleinsäuremolekülen insbesondere die Nucleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit den genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren als auch solche Nucleinsäuremolekülen, die eine ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten Nucleinsäuremolekülen funktionsanalog zu sein sowie solche, die infolge des genetischen Codes degeneriert sind bzw. durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu der genannten Nucleotidsequenz der Nucleinsäuremoleküle sind.

30

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend

10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,

15 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

30 die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert. Mit Vorteil ist es also möglich, durch die Detektion eines erhöhten Levels der genannten Nucleinsäuremoleküle zu bestimmen, ob das transplantierte Organ, das

5 transplantierte Gewebe bzw. die einzelne Zelle von dem Empfängerorganismus in einer Art und Weise akzeptiert wird, dass pathologische Reaktionen weitestgehend ausbleiben.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Nucleinsäuremoleküls, des Vektors, der Wirtszelle, des
10 Polypeptids, des Erkennungsmoleküls und/oder der Vakzine in der medizinischen Prophylaxe, der klinischen Verlaufskontrolle, der Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie. Der Fachmann kann die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle bzw.
15 Vektoren, Wirtszellen, Polypeptide, Erkennungsmoleküle und/oder Vakzine im Bereich der Prophylaxe, Verlaufskontrolle, Diagnostik oder Therapie einsetzen. Beispielsweise ist es möglich, die biologischen Strukturen, die bei einer Abstoßungsreaktion bzw. einer Reaktionskrise
20 in ihrem Level erhöht sind, in Form einer Therapie zu erniedrigen, um somit eine Toleranz bzw. Bedingungen für eine nachfolgende Toleranz des Transplantates zu ermöglichen, zu indizieren bzw. zu unterstützen. Dies kann beispielsweise durch die Gabe von Antisense-Konstrukten bzw. RNA-Molekülen erfolgen, die in der Lage sind, eine RNA-Interferenz zu erzeugen. Es ist jedoch auch möglich, die durch die Nucleinsäuremoleküle kodierten Peptide bzw. Proteine, deren Level auch erhöht sein kann, durch Antikörper funktional so zu beeinträchtigen, dass ein
30 physiologischer Zustand im Transplantat bzw. zwischen Transplantat und Empfängerorganismus indiziert, erreicht oder unterstützt werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, einen verminderten Level von

5 Nucleinsäuremolekülen in Form einer therapeutischen
Maßnahme zu erhöhen, wenn ein verminderter Level mit einer
Abstoßungsreaktion bzw. einer Rejektionskrise assoziiert
ist. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt,
den Level der genannten Substanzen oder Moleküle zu
10 modifizieren, im vorliegenden Fall insbesondere zu erhöhen.
Eine Erhöhung eines Proteinlevels ist beispielsweise
dadurch möglich, dass der Nucleinsäure, die das
entsprechende Protein kodiert, die natürlich im Organismus
oder Transplantat vorliegen kann bzw. in das
15 transplantierte Organ eingebracht wird, ein zusätzlicher
Promoter vorgeschaltet bzw. der ursprüngliche Promoter in
seiner Aktivität verstärkt wird. Weiterhin ist es möglich,
die Kopienanzahl der Nucleinsäuren im entsprechenden
Zielgewebe zu erhöhen, wodurch mehr Nucleinsäuremoleküle
20 bereitgestellt werden und mehr Proteine exprimiert werden
können. Dem Fachmann ist bekannt, dass derartige Maßnahmen
nicht nur innerhalb der Therapie sondern auch in einem
Protokoll zur Prophylaxe bzw. das zur Transplantat-
nachbehandlung durchgeführt werden können. Klinische
Verlaufskontrollen bzw. diagnostische Maßnahmen können mit
Vorteil so erfolgen, dass im Verlauf von bestimmten, durch
den Fachmann festzulegenden Zeitabständen im Urin bzw.
Biopsiematerial eine Quantifizierung der Expression der
Nucleinsäuremoleküle bzw. der sie kodierenden Peptide oder
30 Fragmente erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
werden die Nucleinsäuremoleküle und ihre Homologe bzw. die
modifizierten Nucleinsäuremoleküle zur Detektion von T-

5 Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere von
pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen verwendet.
Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und auch ihre
Abkömmlinge, ihre komplementären Strukturen sowie die
Peptide, die sie kodieren, können beispielsweise genutzt
10 werden, um Komplementreaktionen bzw. andere Prozesse zu
detektieren, bei denen T-Zellen eine gewisse Bedeutung
haben. Insbesondere können pathogene T-zell-vermittelte
Immunprozesse wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide
Arthritis, chronische Darmentzündung, Dermatosen und/oder
15 Allergien detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der
Erfindung werden als T-Zell-vermittelte Immunprozesse
Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen detektiert,
insbesondere eine antiglomeruläre Basalmembrankrankheit,
20 Autoimmunkrankheiten des Nervensystems, ein systemischer
Lupus erythematoses, eine Addison-Krankheit, ein
Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis, ein
Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom,
ein bullöses Pemphigoid, eine thrombozytopenische,
idiopathische Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine
rheumatoide Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes
mellitus, ein Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie,
ein Dermatitis herpetiformis Duhring, eine membranöse
Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine
30 sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendokrinopathien,
multiple Sklerose und/oder Reiter-Krankheit.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische, pathologische und/oder klinische Transplantat-Reaktionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine
10 Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die Vakzine
15 umfasst.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf. So ist es insbesondere möglich, nach Transplantationen eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates durchzuführen; wobei es möglich ist, die als Marker
20 verwendeten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Peptide bzw. Erkennungssubstanzen aus verschiedenen Proben des Patienten, beispielsweise Urin, zu gewinnen. Somit ist es insbesondere möglich, frühzeitig Funktionsverschlechterungen des Transplantates, sozusagen am Beginn der Effektorkette, festzustellen. Durch die erfindungsgemäßen Substanzen und das erfindungsgemäße Verfahren ist es also
25 möglich, bereits subklinisch ablaufende Prozesse frühzeitig zu diagnostizieren. Somit müssen subklinisch verlaufende Reaktionen nicht mehr mit Kontrollbiopsien und konventioneller Histologie bestimmt werden. Weiterhin
30 können die genannten Substanzen als Marker für das Monitoring von Transplantaten benutzt werden, um unerwünschte Immunreaktionen vor der Organschädigung und

5 differentialdiagnostisch sicher zu erfassen. Das Monitoring
kann beispielsweise als Verlaufskontrolle bei Mehrfach-
immunsuppressivaschemata verwandt werden, wobei gutgehende
Funktionen einzelne oder mehrere der immunsuppressiven
Komponenten abgesetzt werden können, wobei das Auftreten
10 von akzelerierten Abstoßungsprozessen frühzeitig erkannt
werden kann. Das Verfahren lässt sich dadurch auch
individuell von Patient zu Patient optimieren. Auch ist es
durch die Marker mit Vorteil möglich, toleranzinduzierte
Protokolle und toleranzinduzierende Therapien auf den
15 Menschen zu übertragen, da nach Absetzen der
Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager
identifiziert werden können, um eine irreversible
Schädigung des Transplantates zu verhindern. Das heißt, die
erfindungsgemäßen Substanzen, das erfindungsgemäße
20 Verfahren und die Verwendungen stellen exakte
Analysemethoden zur Verfügung, um die Induktion, den Erfolg
und die Erhaltung einer Toleranz zu beurteilen. Mit dem
erfindungsgemäßen Verfahren kann unter anderem auch das
Zusammenbrechen der Toleranz, beispielsweise durch
Vorliegen einer Infektion, vorhergesagt werden. Es ist
daher möglich, Entscheidungen über das sichere Absetzen
einer immunsuppressiven Therapie zu treffen, ohne dass
vorteilhafterweise das Auftreten von Reaktionskrisen
riskiert werden muss. Eine wichtige Anwendung der
30 erfindungsgemäßen Nucleinsäure des erfindungsgemäßen
Verfahrens ist daher die Vorhersage von Reaktionskrisen
während oder nach der Behandlung, auch nach konventionellen
Therapien, bevor eine Transplantatfunktionsverschlechterung
auftritt. Weiterhin wird aber auch die konventionelle

5 Immunsuppression durch die erfindungsgemäßen
Nucleinsäuremoleküle und das erfindungsgemäße Verfahren
hinsichtlich der Früherkennung klinischer und subklinischer
akuter Abstoßungskrisen und beginnender chronischer
Reaktionsprozesse verbessert. Es ist durch die Erfindung
10 möglich, die Therapie zu variieren, bevor eine nachweisbare
Schädigung des Transplantates vorliegt. Weiterhin ist es
möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und die
durch sie kodierten Proteine bzw. Proteinfragmente zum
Screening von Arzneimitteln zu verwenden, die bei der
15 Diagnose und Therapie von Transplantat-Reaktionen
eingesetzt werden können.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand von
Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie
darauf einzuschränken.

20

Beispiel

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können in
Labortieren identifiziert werden, so beispielsweise in dem
anerkannten orthotropen Nierentransplantationsmodell: der
25 Ratte, bei dem die Expression der erfindungsgemäßen Marker
zur postoperativen Diagnostik verwendet werden kann. In dem
verwendeten Transplantationsmodell (WF Spendernieren nach
BDIX Rezipienten) kann durch mehrmalige Applikation eines
anti-CD4-Antikörpers RIB5/2 eine Toleranz gegenüber
30 Nierentransplantaten induziert werden, die im
Kontrollantikörper behandelte Empfängertiere zwischen Tag
5 und 9 abgestoßen werden. Die Toleranz zeichnet sich durch
eine lang anhaltende normale Nierenfunktion ohne

5 Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über mehr als
300 Tage aus. Die Infiltration donor-reaktiver T-Zellen ist
nur zu 50% herabgesetzt, jedoch kommt es nicht zur
Zerstörung des transplantierten Organs.

10 Im Rahmen der Erfindung wurden von mit Kontrollantikörpern
bzw. RIB/2 behandelten Empfängertieren die in das
Transplantat eingewanderten mononukleären Zellen am Tag 5
nach der Transplantation durch Kollagenaseverdau und
Ficollgradient isoliert und deren mRNA Expression mit Hilfe
15 der „PCR-Select“ Methode verglichen. Dies führte zur
Isolierung von cDNA Fragmenten, die verstärkt in
Transplantaten rejizierender Empfängertiere exprimiert
werden: 2A5 und 2A15 (entspricht SEQ ID Nr. 1 und 2).
Ebenso konnten cDNA Fragmente isoliert werden, deren
Expression in Transplantaten toleranzentwickelnder
20 Empfängertiere erhöht ist: 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10
(entspricht SEQ ID Nr. 3, 4, 5, 6, 7 und 8). In Abb. 1 sind
die cDNA Sequenzabschnitte der erwähnten Fragmente
dargestellt.

25 Von den hier dargestellten Sequenzabschnitten wurden
weiterhin erfindungsgemäß Oligonukleotidsequenzen für die
Durchführung einer Real Time RT-PCR abgeleitet. Mit Hilfe
dieser Oligonukleotidsequenzen ist eine relative
Quantifizierung der Expression der korrespondierenden
mRNA's in Bezug zum „house keeping gene“ β -actin in
30 Rattenzellen möglich. Ebenso wurden anhand der homologen
Maussequenzen Oligonukleotidsequenzen zur relativen
Quantifizierung der korrespondierenden mRNA's in Bezug zum
„house keeping gene HPRT“ in Mauszellen etabliert.

5 Mit Hilfe der so etablierten Oligonukleotidsequenzen wurden
im Rahmen der Erfindung kinetische Expressionsstudien in
mehreren Transplantationsmodellen durchgeführt. Neben dem
bereits erwähnten Nierentransplantationsmodell in der Ratte
wurde die Expression der Fragmente auch in einem
10 Herztransplantationsmodell in der Maus analysiert. In
diesem Modell wird den Empfängertieren (CBA) 4 Wochen vor
der Transplantation eine donor-spezifisch Bluttransfusion
(B10) in Kombination mit dem anti-CD4 Antikörper YTS177
verabreicht. Das führt zur Induktion einer donor-
spezifischen Toleranz zum Zeitpunkt der Transplantation.
15 Kontrollherzen in unbehandelten Empfängertieren werden
zwischen Tag 7 und Tag 8 abgestoßen.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse für
die Fragmente 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10 im
20 Nierentransplantationsmodell dargestellt. Abgebildet ist
die mRNA Expression der Fragmente im Transplantat für
Kontroll-Antikörper behandelte Empfängertiere (Co) am Tag 0
(naive Nieren), 2 und 5 nach der Transplantation, außerdem
ist die Expression für RIB5/2-behandelte
25 toleranzentwickelnde Empfängertiere (RIB5/2) am Tag 0, 2,
5, 10, 14 und 300 nach der Transplantation dargestellt.
Alle cDNA Fragmente werden in permanent akzeptierten
Transplantaten stark exprimiert, hingegen nimmt ihre
Expression in Transplantaten Kontroll-Antikörper
30 behandelter Empfängertiere zum Zeitpunkt der Rejektion
drastisch ab.

Anschließend wurde die Expression der korrespondierenden
mRNA's im Herztransplantationsmodell untersucht. In Abb. 3

5 ist die Expression der Fragmente 1A50 und T8 im
transplantierten Organ dargestellt. Analysiert wurde die
mRNA Expression in Transplantaten vorbehandelter
toleranzentwickelnder Empfängertiere (DST+YTS177) am Tag 0
(naive Herzen), 2, 5, 7, 8, 10, 40 und 100 nach
10 Transplantation. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der
mRNA Expression im Transplantat unbehandelter Kontrolltiere
(Co) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7 und 8. Auch im
Herztransplantationsmodell weisen permanent akzeptierte
Transplantate eine hohe mRNA Expression an 1A50 und T8 auf.
15 In Transplantaten rejizierender Empfängertiere ist die
Expression wiederum stark vermindert.

Die unterschiedliche Expression an 1A50 und T8
widerspiegelt sich auch im peripheren Blut. Nur in
Blutzellen von unbehandelten Empfängertieren (Co) kommt es
20 kurz vor der Rejektion (Tag 5) zum Abfall der Expression
von 1A50 und T8 (Abb. 4).

Weiterhin wurde die Expression der cDNA Fragmente 2A5 und
2A15 im Nierentransplantationsmodell (Abb. 5) und im
Herztransplantationsmodell (Abb. 6) untersucht. Dargestellt
ist jeweils die Expression dieser cDNA Fragmente im
25 Transplantat rejizierender Empfängertiere. In beiden
Modellen kommt es zur Hochregulation der mRNA Expression
kurz vor der Rejektion.

Mit Hilfe der Identifizierung und Quantifizierung von
30 solchen Genmarkern, deren Expression im Transplantat, in
Flüssigkeiten aus dem Transplantat (Urin, Lavage) oder
peripherem Blut entweder mit einer lang anhaltenden guten
Transplantatfunktion oder dem Auftreten von Rejektionen

5 korreliert, wäre eine Beurteilung der toleranzinduzierenden Therapie besser möglich.

Die Expression von 2A5 und 2A15 kann in der Biopsie zur Beurteilung von akuten subklinischen Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen verwendet werden. Dabei
10 wäre eine starke, lang anhaltende Expression mit einer Rejektion des Organs assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden Empfängertieren im Nierentransplan-
15 tationsmodell die Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert ist. Dies würde die Auswertung einer Biopsie erheblich verbessern, da nicht nur die Infiltration in das Organ als Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird, sondern auch qualitative Veränderungen
20 der infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10, 3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie kann z.B. zur Beurteilung des Therapieerfolges herangezogen werden. Dies würde eine Entscheidung über die sichere Beendigung der toleranzinduzierenden Therapie ermöglichen.

25 Der starke Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor klinischer Manifestation der Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut des Patienten bevor eine Organverschlechterung (z.B. Anstieg des Serumkreatinins)
30 nachweisbar ist.

Die Expression von 2A5 und 2A15 in der Biopsie kann zur Beurteilung von akuten klinischen und subklinischen Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen

5 verwendet werden. Dabei ist eine starke lang anhaltende
Expression mit einer immunologischen Rejektion des Organs
assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der
Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da
in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden
10 Empfängertieren im Nierentransplantationsmodell die
Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert
ist. Dies verbessert die Auswertung einer Biopsie
erheblich, da nicht nur die Infiltration in das Organ als
Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird,
15 sondern auch die qualitative Veränderung der
infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie wird zur Beurteilung des
Therapieerfolges herangezogen. Dies ermöglicht eine
Entscheidung über die sichere Beendigung der
20 toleranzinduzierenden Therapie. Der starke
Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in
rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor der
Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut
oder anderen Körperflüssigkeiten, wie in dem Urin, der
Patienten bevor eine Organverschlechterung, wie der Anstieg
des Serumkreatinins, nachgewiesen werden kann. Somit ist
folgendes Diagnostikmodell nach der Transplantation
erfolgreich:

- 30 1. Nachweis von 1A50 und T8 im Blut oder anderen
Körperflüssigkeiten (z.B. Urin) des Patienten täglich
kurz nach der Operation und wöchentlich/monatlich im
weiteren Verlauf, um eine Rejektionskrise und damit
Fehlschlagen der Therapie vorherzusagen bzw. bei

5 Absetzversuchen eine Untersuppression zu detektieren,
bevor eine Organverschlechterung nachweisbar ist.

2. Nachweis von 2A5 und 2A15 in Kontrollbiopsien oder
transplantatrelevanten Körperflüssigkeiten (z.B. Urin
bei Nierentransplantation), um ebenfalls
10 Rejektionskrisen bzw. eine Untersuppression
rechtzeitig zu detektieren und die Gefahr der
Entwicklung einer chronischen Abstoßung vorherzusagen.

3. Nachweis von T4, T5, T8, T10, 1A50 und 3A29 in
Kontrollbiopsien oder transplantatrelevanten
15 Körperflüssigkeiten, um den Erfolg der
toleranzinduzierenden oder konventionellen Therapie
einzuschätzen, insbesondere, um das gefahrlose
Absetzen/Reduzieren der Therapie zu ermöglichen.

5

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

10

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,

15

b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,

20

c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

25

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

- 5 2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 40%
homolog zu einer der unter a) angegebenen
Nucleotidsequenz ist.
- 10
3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens
15 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders
bevorzugt 90% homolog zu einer der unter a) angegebenen
Nucleotidsequenz ist.
- 20 4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass
es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA
ist.
- 25
5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 4.
- 30 6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.

5 7. Polypeptid, kodiert durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß
einem der Ansprüche 1 bis 4.

10 8. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein
Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,
einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß
Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.

15 9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, dass
es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein
Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-
Interferenzmolekül.

20

25 10. Vakzine, umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem
der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5,
eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein
Polypeptid gemäß Anspruch 7 und/oder ein
Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 gegebenenfalls
mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

30 11. Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen in
einer Probe von einem Patienten,
dadurch gekennzeichnet, dass

5 in der Probe ein Level von mindestens einem
Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Anspruch 1 bis 4
bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer
Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen
wird, wobei durch einen modifizierten Level in der
10 Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die
Transplantat-Reaktionen bzw. das Fehlen selbiger
(Toleranz) detektiert wird.

15 12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe
bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Niere, Leber, Pankreas
allein oder in Kombination und/oder von Geweben,
20 insbesondere Inseln, Aorten, Knorpel.

25 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,
dadurch gekennzeichnet, dass
als der Level eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine
Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure,
eine Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder
eine Konzentration von Isoformen, bestimmt werden.

30

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt wird.

5

10

15

20

30

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
als die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf
detektiert werden.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass
durch einen verminderten Level eines
Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären
Nucleotidsequenzen die Abstoßungsreaktion, der
Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise
detektiert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass
durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül
umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der
Gruppe bestehend aus SEQ ID 1 und Nr. SEQ 2 oder deren
komplementären Nucleotidsequenzen die
Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die
Rejektionskrise detektiert wird.

5

10

15

20

25

30

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert wird.

19. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, eines Vektor gemäß Anspruch 5, einer Wirtszelle gemäß Anspruch 6, eines Polypeptid gemäß Anspruch 7, eines Erkennungsmoleküls nach Anspruch 8 oder 9 und/oder einer Vakzine gemäß Anspruch 10 in der medizinischen Prophylaxe, klinischer Verlaufskontrolle, Transplantat-nachbehandlung, klinischer Diagnostik und/oder Therapie.

20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Detektion von T-Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen.

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20,

5 dadurch gekennzeichnet dass
 die T-Zell-vermittelten Immunprozesse
 Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen sind,
 insbesondere eine antiglomeruläre
 Basalmembrankrankheit, Autoimmunkrankheiten des
 10 Nervensystems, ein systemischer Lupus erythematoses,
 eine Addison-Krankheit, ein Antiphospholipid-Syndrom,
 eine IgA-Glomerulonephritis, ein Goodpasture-Syndrom,
 ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, ein bullöses
 Pemphigoid, eine thrombozytopenische, idiopathische
 15 Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide
 Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein
 Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie, ein
 Dermatitis herpetiformis Duhring, eine membranöse
 Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine
 20 sympathische Ophthalmie,
 Autoimmun-Polyendokrinopathien, multiple Sklerose
 und/oder Reiter-Krankheit.

25

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21,
 dadurch gekennzeichnet dass
 die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische,
 pathologische, klinische und/oder subklinische
 Transplantat-Reaktionen sind.

30

23. Verwendung nach Anspruch 22,
 dadurch gekennzeichnet, dass

5 die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

10 24. Kit umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7, ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 und/oder eine Vakzine gemäß Anspruch 10.

5

Zusammenfassung

10

15

Die Erfindung betrifft Immunmarker zur Detektion von Entzündungen, Immunreaktionen und insbesondere von Transplantattoleranzen bzw. Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen oder -toleranzen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantat-Nachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen.

SEQ ID Nr. 1

(Seq ID: 2A5)

ACTTTCTCTA TAGCTCCTGG TAAGTAAATT TCTTTCTCCA ATACTTTTTG 50
AGTTAAATGT TTTAGTTTAT GTGGGGGTTT AGTTATGTTG GTTGGTTGTA 100
G 101

SEQ ID Nr. 2

(Seq ID: 2A15)

TTTTTAAAA AGCAGCCGGG GCCTGGGGTT TCTACCCGTG TACCAGGGGC 50
CCTCTGGCCC AGAGCTGACC AAATCTGGCT CCATGGAGCA CACAGAGGCT 100
TTGATCAGGG ACAGTAATCC TCTGCAACAT CAGGAATGGC TGAATGCACA 150
GGATTACCA AGCCTCAGCC AAAGCATCCC GTGGCCTGAT GTCTCGGAGC 200
AACCCTGTCC ACACGAGGAA AGGTCAGGCC TGCTCAACAT GACCAAGATT 250
GCTCAAGGAG GGCGCAAAC CAGGAAGAGC CGGGGCCCTG CTTGGGTAG 299



SEQ ID Nr. 3

(Seq ID: 1A50)

GACTTTATTC ACAATAGAGA AATTTTACAA ATATAATTTT TAAAAATTAT 50
GTGTCAATCT ATTATGTTTT CCGTAACATC AGAGATTTAT ATAAAGTTGG 100
AAACAACAGA ATGCACTTAT GAACAAATCA AAAACAATGT TTAAATTGGA 150
TGGATACACA CGACAGAGAA GTCCTGAGT TCTCTAAATG AGCACACAAC 200
TTATAGGTGT ATATTAAGT CACAAAGTAT CCAAAACATG TTTGTAACAC 250
AAAATCGGGT GCTACTTTAA CTGCTCACCT TTAAGGGCGT GGATCATACA 300
TGTAAGTCAA ATTGCACAGC TTTGTTGGAA ATGAATGACT CGTCATCTAT 350
TTGGAGACTT CCGTTGCTTA AAATTGACAC AAAAGCCTAA TCAATTACGC 400
TACTATAAAA TTTGTCTCTT ATCTCGTTTA AATTTTGGT GTTCTGTGAT 450
CTGGCATTAA AAAACAGTCC AAGTTTTAAA ACAGAAAACA TTGCTCGCCA 500
TTTGGAGAGT AGCTCGTGGT TCGGCTTCCT CCCTGCTCGA ACCGGAACAA 550
CGCTACAGT 560

SEQ ID Nr. 4

(Seq ID: 3A29)

ACATTCATTA TTAAATGTGA TAATAGAGGT AGAGGTATAA ATAATATGAA 50
GGGGTGAGGG AACCAGTTCT ACCCGGTTTG TTTTGAATGC TTAAATTATG 100
TAATTTAAAT AGATAATCTT TACTTATGTA GGTCTTTTGG AAATAACTTT 150
ATAAATTTAA CACAGAGGAC TACTACTAAA CGTGAGAGGT ATGATAATCG 200
GCATGGAAGT TGGGCTGGTT GACCACCAAA GTTCAATTCT TAAAGACATC 250
TTAATCCTGA ATATAAAAAT GCCTTTGTGG GTTTAGAATT AGAATTTAAT 300
TTTGGCATT 310

SEQ ID Nr. 5

(Seq ID: T4)

ACTGCATGAT GGGTTTTATT GAGACCAGGG GACAGTGTGA CACTCAGGGG 50
TTTTCCTTCA TAACTTCTTT TATCCAGGAG GTGAACCTAA TAAGTTTGGT 100
GTAGATGGCT GGCATGTTGG TTTTGGCGCA TGATAG 136

SEQ ID Nr. 6

(Seq ID: T5)

CTATCATGCG TGTAAGTCTTG GTGCCCTGGC CGAGTTAGAA GCCAGCTGAG 50
ATAGCTTGCA GCATCTCTTC TAGTTTGAGT GATGATGTAA TGAGGAAAAT 100
CTAGTAGGTA GAAAGAGTTC AGGAAGAAGG AAACCTCCT CTGCCTTTGA 150
AAAGAGGCTC TGCAGGAGCA TCACGCCCTT CACAGAGAAG AGTGTAGACT 200
GGCTTTCCAC TAGTGTTGAA CCTACACTCT TCGGTGGGTT AACAGTCATG 250
TGCTCGCCAT CAGAGCCTTT TTGCATGCAG TGGTGGGCTC TCCCGGTTTA 300
TCCACCTCC CACAGGTGAT TAAACCACAG CCCTGTAAAA AAAAAA 347

SEQ ID Nr. 7

(Seq ID: T8)

TTACCCACAG TGCATTATAA CAAAGGAGAT GCTAAAGTCA GTTTTTCATG 50
TTTGTGGTTT TTCTGAAACA TCATTCATTT AAACAATTCA AATATATGTT 100
CAAAATAAGA AGTGGTTTAT AAAAGGATTG TGTGTGCCAT GTGGCTTTTG 150
ACCCGTGCTA TTATAAATGT TGCCATAAAT ACTCTCTATA AGAAACAGTC 200
CTTAAGTAGA TTTGGTGGCA CACATCTTTA ATCCCAGCAC TTGGGAAGCA 250
GAGACAGGTG GATCTCTGTG AGTTTAAGAC CAACCTGGTC TATAAAGTGA 300
GTTCCAGGAC AGCCAGGGTT GTTAAACATA GAGAACTCT GGGGCGATGG 350
GGAGGGGTCT CGTCAAACAT GAAATTTATT AGAAAATTGG TCGGATTAAG 400
CTATGTCTAG TATCAACTAA TATGGAATCT TGTATAATCT GTGTTACATT 450
GGATTTGTCT CAGAACTAAT TGTTTCATAA TAAACTATGC CTTGGCCACC 500
ACGAAAAAAA AAA 513

SEQ ID Nr. 8

(Seq ID: T10)

AGGCTAGGGC TAGTTCTGCG GACCCTCTCG GAGAGAGGAA TAAGGTTGAA 50
CTGCCTGTCC GGTCTCCTT CCCCTATTCC CAGATGCAGG TGGAAGCCTC 100
CCTCTAGTCC TTCCCCCTAA CCGCGACGAA GACCTTGGCT AACACTTGCT 150
CCTTTCGCAC ACCATAGAAA ATGCAGTGCA GACAAACACA GCCTCGTCAG 200
GCGCTTGAGG AGCGAAGTCC AATCTGGGTC GGCACCTGCA CCAGGTCTTT 250
GCGCACCTGG TCAGAAGACC GGCACCCAAT AGTTGCTTAT TAAACTCTAC 300
GTTTGTCCCG AAA 313

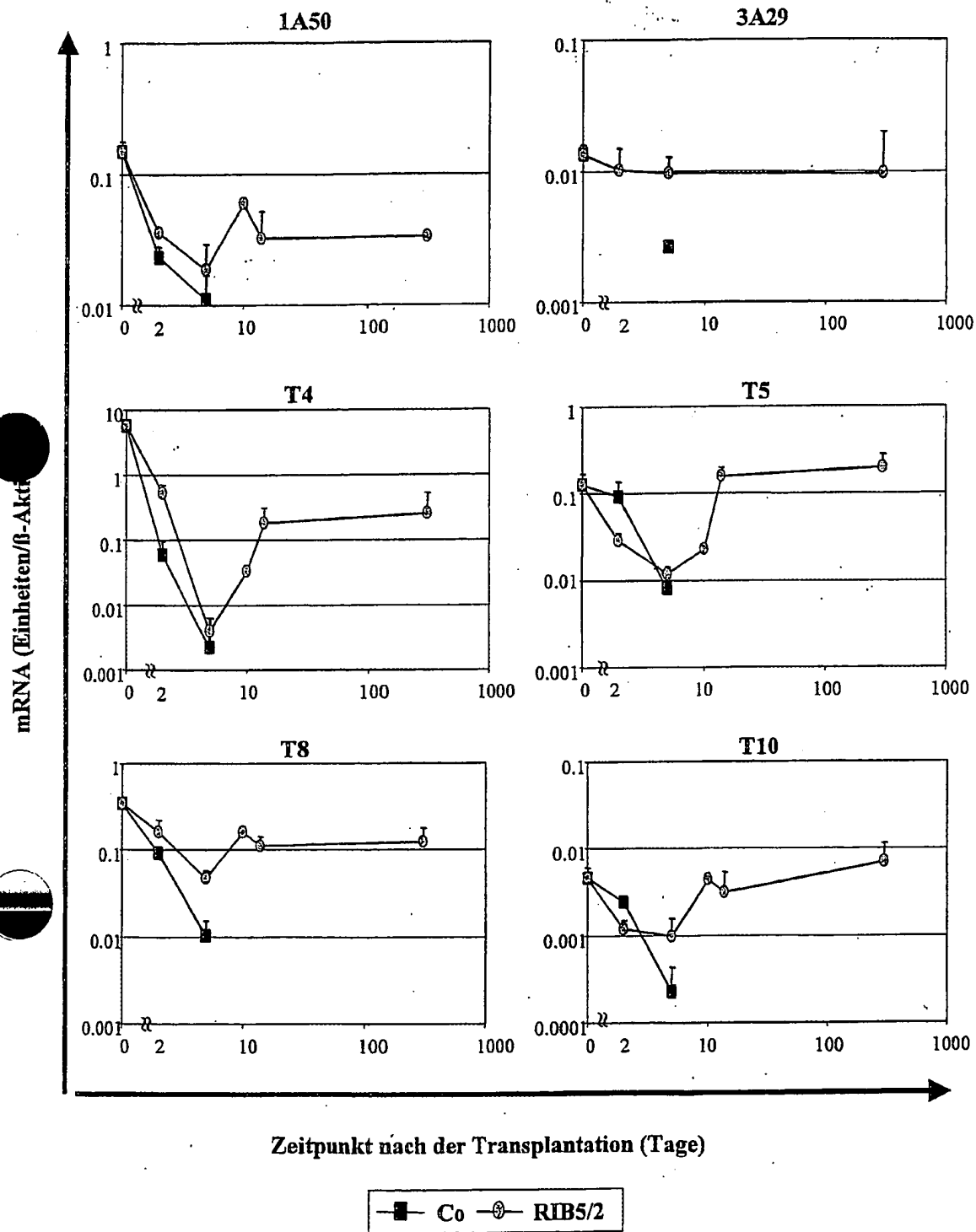


Abb. 2

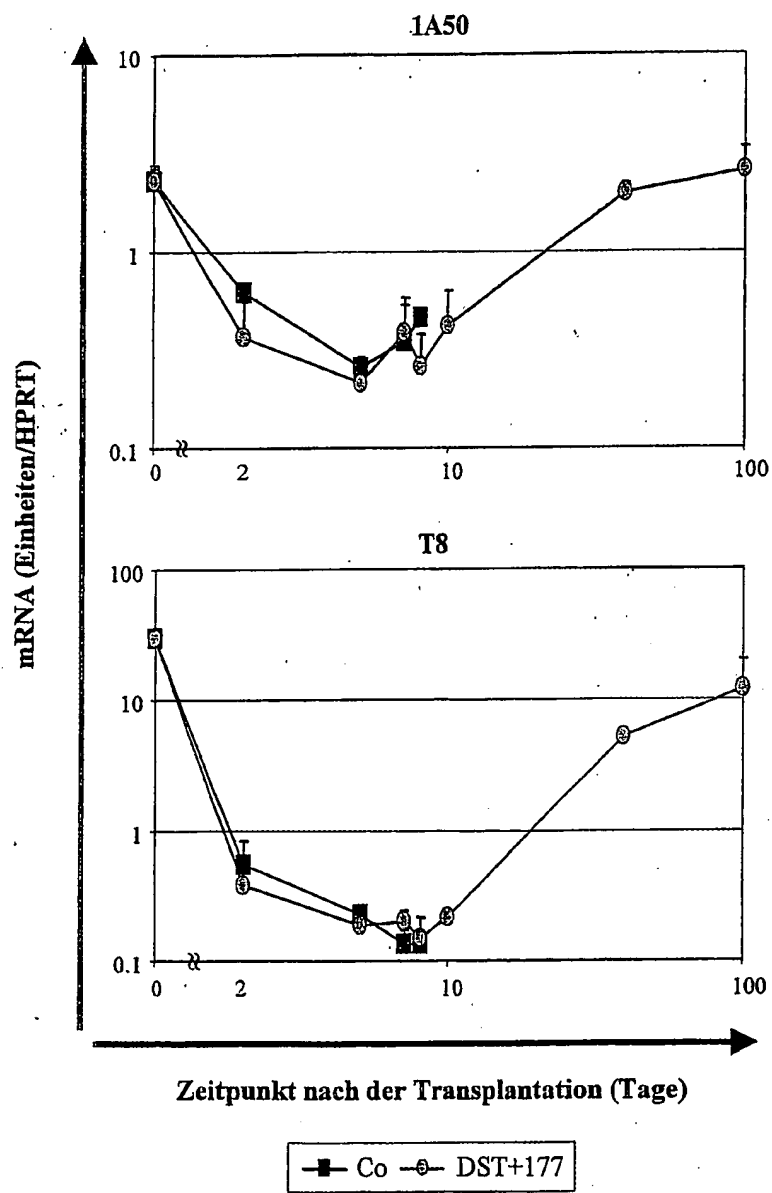


Abb. 3

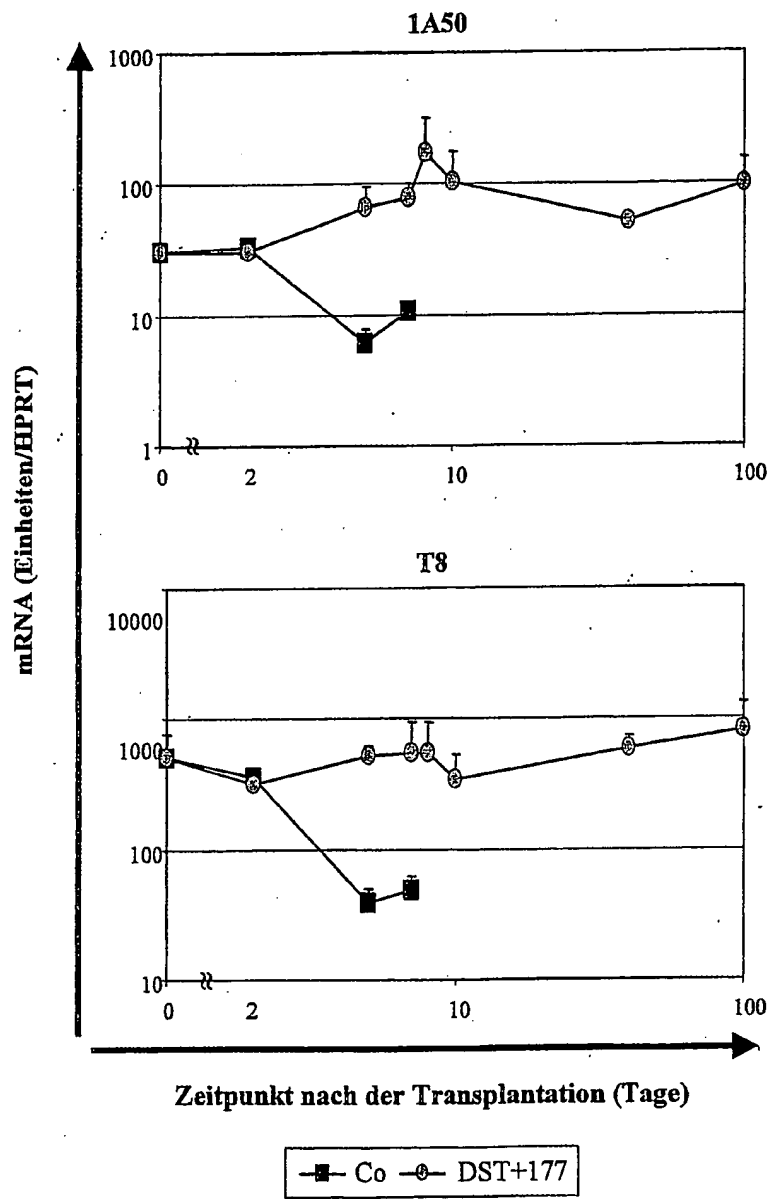


Abb. 4

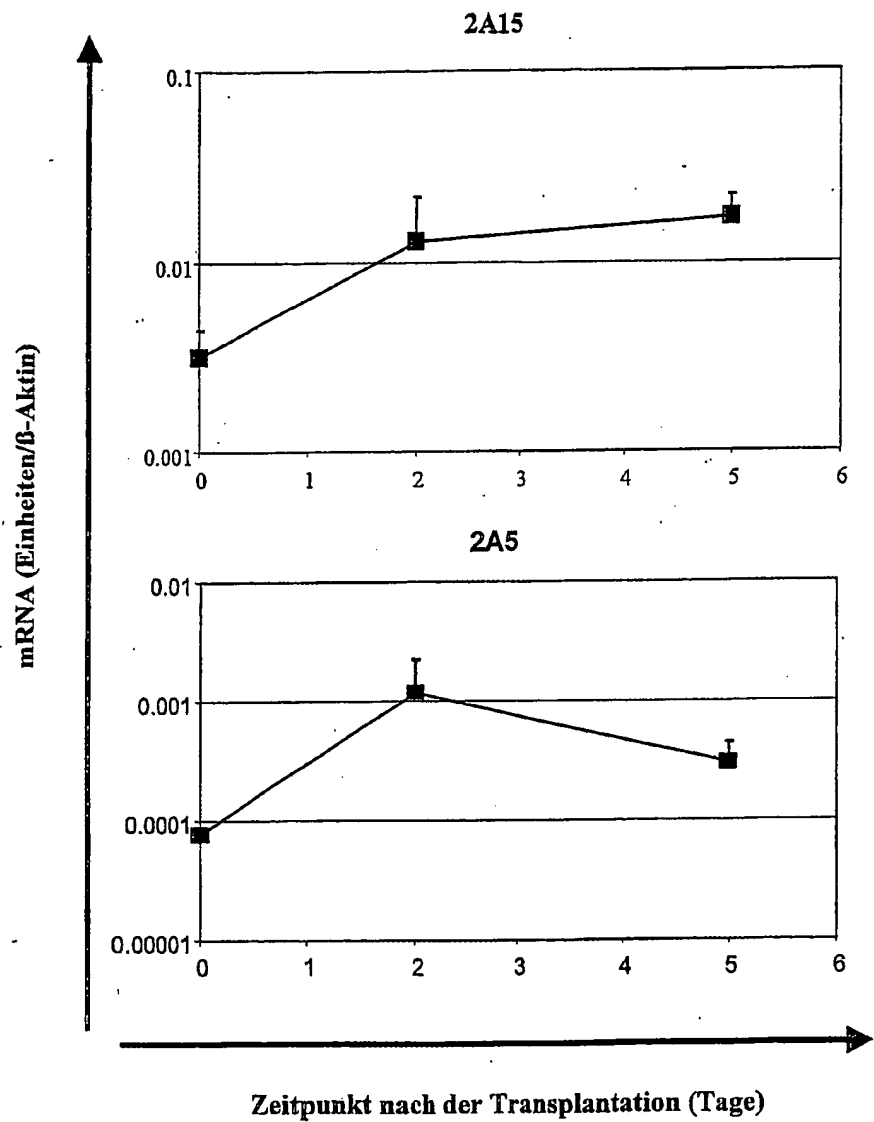


Abb. 5

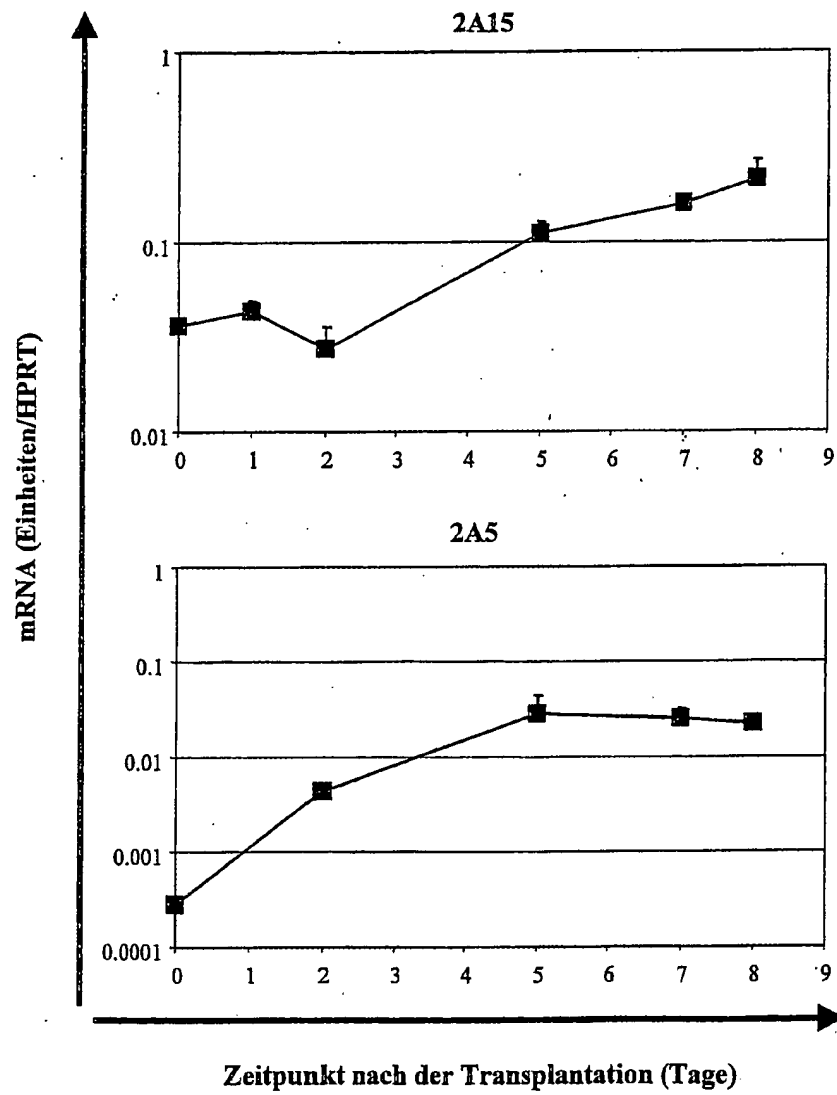


Abb. 6